Литература

1. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина М.: ВНИТИБП, 1998. С. 672–683.
2. Генетическая характеристика полевых изолятов вируса инфекционного бронхита кур, выявленных в России / Е. В. Овчинникова, Ю. А. Бочков, Г. В. Батченко [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. Т. 5. Владимир, 2007. С. 303-317.
3. Изучение спектра полевых изолятов вируса инфекционного бронхита кур в России с использованием молекулярно-биологических и серологических методов / А.В. Борисов, Ю.А. Бочков, С.В. Фролов [и др.] // Птицеводство – мировой и отечественный опыт: матер. конф. М., 2002. С. 23-24.
4. Условия получения трахеальной органной культуры куриных эмбрионов для выделения и типирования вируса инфекционного бронхита кур / О. А. Чупина, С. В. Фролов, В. И. Диев [и др.] // Сибирская язва и др. опасные инфекц. болезни жив-х: матер. по теме работы круглого стола, приуроченного к 80-летию академика РАСХН Бакулова И. А. Покров, 2005. С. 225-227.
5. Филогенетический анализ изолятов вируса инфекционного бронхита кур, выявленных в России / Ю.А. Бочков, А.В. Борисов, Л.О. Щербакова [и др.] // Аграрная Россия. 2002. №2. С. 11-16.
6. Coronaviruses from pheasants (Phasianus colchicus) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys / Cavanagh D., Mawditt K., Welchman D. de V.[et al.] // Avian Pathol. 2002. Vol. 31, № 1. P. 81-95.
7. Differentiation of avian infectious bronchitis virus field isolates in Russia using molecular-biological and serological methods / Y. Botchkov, A. Borisov, V. Irza [et al.] // 11th European Poultry Conference: Bremen, Germany. 6-10 Sept. Bremen, Germany, 2002. P. 176.
8. Lee, C.W. Typing of field isolates of infectious bronchitis virus based on the sequence of the hypervariable region in the S1 gene / C.W. Lee, D.A. Hilt, M.W. Jackwood // J. Vet. Diagn. Invest. 2003. Vol.15, N 4. P.344-348.
9. Liu, S. New genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and nonvaccinated flocks in China / S. Liu, X. Kong // Avian Pathol. 2004. Vol.33, N 3. P. 321–327.
10. Mondal, S.P. Isolation and characterization of a novel antigenic subtype of infectious bronchitis virus serotype DE 072 / S.P. Mondal, B. Lucio-Martinez, S.A. Nagi // Avian Dis. 2001. Vol. 45, N 4. P. 1054–1059.

УДК 619:616.98:587.832.1:598.2:573.6.086.83:57.083.3

М.А. Циванюк, Н.Н. Луговская, Н.С. Мудрак, В.В. Дрыгин, Е.В. Белик

РАЗРАБОТКА КОНКУРЕНТНОГО ВАРИАНТА ИФА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГРИППА ПОДТИПА Н5 У РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ПТИЦ

Введение

Грипп птиц (ГП) – острая контагиозная вирусная инфекция домашних и диких птиц, характеризующаяся общим угнетением, отеками, множественными кровоизлияниями и поражениями внутренних органов, мозга и кожи. Вирусы гриппа имеют сегментированную одиночную отрицательно закрученную цепочку РНК и относятся к семейству *Orthomyxoviridae*. Вирусы гриппа типа А разделены на подтипы, основанные на антигенном родстве поверхностных гликопротеинов, гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (NA). В настоящее время существует 16 НА подтипов (Н1-Н16) и девять подтипов NA (N1-N9). До настоящего времени только вирусы подтипов Н5 и Н7 вызывали высокопатогенный грипп птиц (ВПГП) у восприимчивых видов [6].

За последние 10 лет не только увеличилось количество вспышек ВПГП, но и число вовлеченных птиц, а также материальные затраты на борьбу с заболеванием. Кроме того, беспрецедентное появление и распространение высокопатогенного вируса ГП H5N1 в России и за ее пределами выдвинуло ГП на первое место среди опасных болезней животных [6].

Существует несколько методов для выявления подтипоспецифических антител к вирусу ГП. Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) является «золотым стандартом» при диагностике гриппа, но при исследовании сывороток крови уток и некоторых других видов птиц антитела могут не выявляться из-за действия неспецифических ингибиторов, для устранения которых сыворотки необходимо подвергать обработке, снижающей уровень специфических антител [1]. Наиболее достоверные результаты по титро-

ванию антител дает реакция нейтрализации. К тому же она позволяет обнаруживать вируснейтрализующие антитела, которые непосредственно создают в организме защиту против вирусов [3]. Данный метод требует для постановки значительного времени и специализированного оснащения лаборатории при работе с высокопатогенным вирусом ГП подтипа H5N1. Всех этих недостатков лишен конкурентный вариант ИФА.

Зарубежная фирма «Anigen» (Корея) выпускает коммерческие иммуноферментные наборы для выявления антител к вирусу ГП подтипа Н5, но их массовое применение ограничено высокой стоимостью [2, 4].

Поэтому, в связи с ситуацией по гриппу, сложившейся в Российской Федерации в 2005-2006 г.г., и проводившимися мероприятиями по ограниченной вакцинации домашней птицы в зонах повышенного риска, актуальным является разработка высокочувствительной и специфичной отечественной тест-системы для выявления антител к вирусу ГП подтипа Н5 при проведении мониторинговых исследований и оценке уровня поствакцинального иммунитета у привитой птицы [5].

Таким образом, целью нашей работы была разработка отечественной тест-системы на основе конкурентного варианта ИФА для выявления антител к вирусу ГП подтипа Н5 при исследовании проб в одном разведении и сравнение полученной тест-системы с РТГА.

Материалы и методы

Антиген вируса гриппа птиц подтипа H5N1. Очистку и концентрирование антигена вируса гриппа птиц подтипа H5N1, полученного в перевиваемой культуре клеток MDCK, проводили согласно ранее описанной методике [4].

Контрольные пробы. В качестве положительного контроля использовали сыворотку крови кур против вируса ГП (ФГУ «ВНИИЗЖ»); в качестве отрицательного – сыворотку крови птиц, не содержащую антител к вирусу ГП (ФГУ «ВНИИЗЖ»).

Конъюгат антивидовых антител. Использовали коммерческий препарат антивидового иммунопероксидазного конъюгата против IgG мышей (ГУНИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва).

Моноклональные антитела (МАт) к гемагглютинину Н5. Использовали МАт к гемагглютинину Н5, полученные из Института экспериментальной медицины (Москва).

Постановка конкурентного варианта ИФА для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н5. Во все лунки планшета, содержащие сенсибилизированный антиген вируса ГП подтипа Н5, вносили буфер ТБС (трис-HCl буферный раствор, содержащий 0,1% твина-20) в объёме 0,025 см^3. В лунки А1-В1 вносили буфер ТБС (контроль моноклональных антител) в объёме 0,025 см^3, в лунки С1-D1 (контроль конъюгата) – в объёме 0,075 см^3. После этого наносили разведенные 1:2 в рабочем буфере ТБС контрольные и испытуемые пробы сывороток. Далее во все используемые лунки микропланшета вносили по 0,05 см^3 рабочего разведения МАт (кроме контроля конъюгата). После 30 минутной инкубации при 37° С и трехкратной промывки раствором ТБС в каждую лунку заливали раствор антивидового пероксидазного коньюгата, взятого в рабочем разведении. Планшеты инкубировали 30 минут при 37° С, трижды промывали ТБС и вносили для окрашивания субстрат АБТС (40 мМ 2,2-азино-ди(3-этил) бензтиазолинсульфоновая кислота с 4 мМ H_2O_2 в 100 мМ цитратном буфере) на 10-15 минут. Реакцию останавливали добавлением 1%-ного ДСН (додецил сульфат натрия), после чего измеряли оптическую плотность содержимого каждой лунки на спектрофотометре «SLT» (Австрия) при длине волны 405 нм. Значения ОП контрольных и исследуемых проб переводили в значение процента ингибиции (ПИ) по формуле:

$$\text{ПИ}=\frac{\text{ОП}_{\text{иссл.пробы с МАт}}-\text{ОП}_{\text{контроля конъюгата}}}{\text{ОП}_{\text{контроля МАт}}-\text{ОП}_{\text{контроля конъюгата}}}(1-)\text{x}100,$$

где: $\text{ОП}_{\text{иссл.пробы с МАт}}$ – среднее значение оптической плотности смеси исследуемой пробы с моноклональными антителами к гемагглютинину Н5;

$\text{ОП}_{\text{контроля МАт}}$ – среднее значение оптической плотности контроля моноклональных антител к гемагглютинину Н5;

$\text{ОП}_{\text{контроля конъюгата}}$ – среднее значение оптической плотности контроля конъюгата.

Коммерческие наборы:

- Набор для выявления антител к вирусу гриппа птиц в блокирующем варианте ИФА «AIV Ab ELISA», «Anigen» (Корея);
- «Набор для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н5 в реакции торможения гемагглютинации» (ФГУ «ВНИИЗЖ»);
- референтные антигены и сыворотки к 15 ГА подтипам вируса ГП «Институт зоопрофилактики» (Италия);
- референтный антиген вируса ГП подтипа H5N9 «NVSL» (США).

Таблица 1

Комплексное исследование моноклональных антител к гемагглютинину Н5 вируса гриппа птиц

МАт	Концентрация белка	Вестерн-блоттинг	РТГА		Н-ИФА ВНИИЗЖ	К-Н5-ИФА «Anigen» (Корея)
			АГ H5N1 (ВНИИЗЖ)	АГ H5N9 (США)		
8Д2	2 мг/мл	+	1:512	>1:4096	1:12800*	91%**
11А9	2,8 мг/мл	+	1:128	1:2048	1:6400	86%
15А6	2,4 мг\мл	+	1:256	>1:4096	1:6400	90%
19С11	1,6 мг/мл	+	1:64	1:1024	1:3200	51%
7Е6	н/и	+	>1:4096	н/и	1:25600	59%
17Н5	н/и	+	1:1024	н/и	1:25600	82%
11В4	н/и	+	1:128	н/и	1:6400	87%

* – проба считается положительной, если титр антител ≥1:1280;

** – проба считается положительной, если % блокирования составляет ≥75

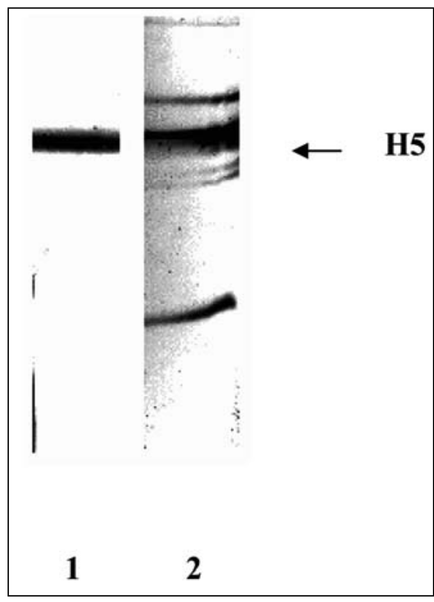


Рис. 1. Иммуноблоттинг Аг Н5, х50 с МАт к ГА Н5 вируса ГП 19С11 (дорожка 1) и сывороткой против ГП подтипа H5N1 (дорожка 2)

Все наборы использовали согласно наставлениям по применению.

Компьютерный учет результатов. Учет результатов конкурентного варианта ИФА, обработку, хранение и анализ полученных данных проводили с использованием компьютерной программы «СИНКО-ИФА» (ФГУ «ВНИИЗЖ»).

Результаты и обсуждение

Разработка тест-системы включала в себя подбор моноклональных антител к Н5, определение рабочего разведения сывороток, МАт и конъюгата, а также установление позитивно-негативного порога.

Определение рабочих разведений МАт и антивидового конъюгата. Оптимальную концентрацию МАт и антивидового конъюгата определяли путём постановки непрямого варианта ИФА методом двукратных последовательных разведений препаратов по блок-схеме («шахматный» порядок постановки). За рабочее разведение каждого из компонентов принимали последнее разведение каждого, обеспечивающее ОП=1,0 ед.

Подбор моноклональных антител к гемагглютинину Н5 вируса ГП. Из Института экспериментальной медицины (Москва) получили 7 образцов моноклональных антител к гемагглютинину Н5 вируса гриппа: 19С11, 15А6, 11А9, 8Д2, 6С8, 17Н5, 11В4. МАт исследовали в РТГА с применением коммерческого «Набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н5 в реакции торможения гемагглютинации» (ФГУ «ВНИИЗЖ») и референтного антигена («NVSL», США) – в непрямом варианте ИФА с использованием АГ Н5 (ФГУ «ВНИИЗЖ») и конкурентном варианте ИФА с использованием коммерческого набора фирмы H5 Ab AIV «Anigen» (Корея), а также при проведении электрофореза и иммуноблоттинга. Результаты исследования в ИФА и РТГА с АГ H5N1 представлены в табл. 1.

Все образцы МАт получены к ГА Н5, что подтверждали проведением иммуноблоттинга с АГ Н5.

Для разработки тест-системы на основе К-Н5-ИФА мы исследовали различные МАт с референтными сыворотками к 15 ГА подтипам производства «Института зоопрофилактики» (Италия). В табл. 2 представлены ПИ тестируемых референтных сывороток при исследовании с различными МАт.

Для разработки конкурентного варианта ИФА (К-Н5-ИФА) выбрали препарат 19С11, так как при его использовании все сыворотки Н5 ГА подтипа имели максимальные значения ПИ, а сыворотки остальных 14 ГА подтипов вируса ГП – минимальные.

Таблица 2

Исследование референтных сывороток к 15 гемагглютинирующим подтипам вируса гриппа птиц с использованием различных МАт

Сыворотки \ МАт	19С11	8Д2	15А6	11А9	7Е6	17Н5	11В4
H1N1	19	8.7	17.8	15.6	-31.8	24.2	-7.9
H2N3	0.08	22.8	20.5	26.2	27.2	28.5	-11.1
H3N8	12	19.2	16.4	-1.7	8.6	16.4	-16.8
H4N8	8	17.7	11.5	18.4	-31	14.2	-3.9
H5N1	94	68.6	69.5	75.8	50.4	77.2	46.9
H5N2	74	47.1	36.6	51.2	53.6	86.5	0.90
H5N3	84	51.5	54.3	90.4	36.9	99.9	82.4
H5N9	87.5	84.2	81	61.5	79.3	86.6	11.5
H6N2	21	19	25.3	22.2	-47.7	28.5	-27.6
H7N1	16.7	23.5	1.2	7	1.2	12.7	14.6
H7N3	17	18.2	8.4	22.2	1.1	19.3	28.4
H7N7	12	10.3	2.8	11.1	н/и	н/и	н/и
H8N4	8	29.2	21.1	27.4	-13.5	-9.9	-14.7
H9N2	10	5.6	20.9	13.8	6.1	7.5	7.2
H10N1	6	13.7	19.4	95.5	6.8	25.5	31.3
H11N9	18	4.7	6.8	5.6	-31.6	24.2	27.9
H12N5	33	17.7	0.3	7.1	23.8	40.6	42.5
H13N6	18	17.5	10.3	18.9	-45.1	30.2	3.4
H14N5	23	17.1	22.5	35.2	-41.6	22.9	-0.3
H15N9	27.8	17.4	7.9	7	31.2	20	-12.5

Таблица 3

Определение рабочего разведения сывороток для постановки в К-Н5-ИФА

№	Титр в РТГА, log_2	Разведение				
		Цельное	1:2	1:4	1:8	1:16
1	< 1:2	8,61*	4,80	1,81	9,42	21,47
2	< 1:2	14,58	8,70	2,26	3,44	11,50
3	< 1:2	7,34	1,36	1,09	5,62	6,70
4	< 1:2	1,54	2,72	0,63	3,53	11,50
5	< 1:2	12,23	7,52	0,27	4,17	8,70
6	< 1:2	2,45	1,90	2,54	3,44	6,79
7	< 1:2	3,62	3,99	2,08	1,36	7,25
8	< 1:2	7,97	3,62	4,44	2,46	2,26
9	< 1:2	20,62	2,85	4,04	3,52	0,33
10	< 1:2	11,29	10,48	7,00	8,70	5,00
11	< 1:2	27,43	12,70	9,14	4,92	1,89
12	< 1:2	15,96	14,11	9,14	8,03	3,30
13	< 1:2	26,18	19,44	9,81	8,26	2,92
14	< 1:2	13,74	11,14	9,66	5,66	0,70
15	< 1:2	9,29	7,66	6,85	5,89	1,44
16	< 1:2	2,18	0,04	2,92	2,33	6,85
Среднее значение отрицательного контроля	< 1:2	10,49	7,06	4,61	5,05	6,16
17	7	95,83	91,67	77,45	69,02	53,89
18	3	86,14	88,41	63,59	52,63	32,07
19	5	95,11	93,75	82,79	74,82	58,06
20	4	90,94	85,24	65,85	59,06	47,64
21	7	74,82	68,39	51,18	42,39	39,58
22	5	57,35	58,61	35,88	29,29	23,95
23	4	82,82	78,90	45,72	34,62	27,58
24	7	96,96	96,15	83,04	76,38	72,23
25	6	87,86	87,49	60,46	46,98	38,32
26	5	88,52	89,41	64,98	51,20	42,54
Среднее значение положительного контроля	5,3	85,64	83,80	63,09	53,64	43,59

* – ПИ

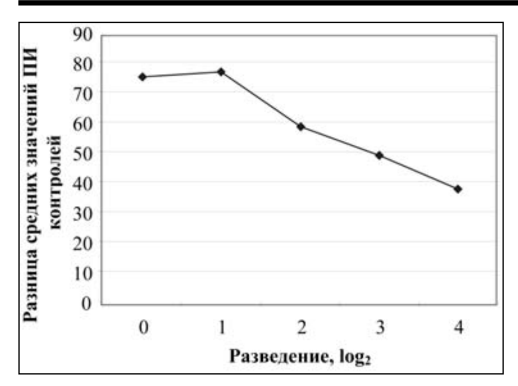


Рис. 2 Зависимость разницы средних значений ПИ положительного и отрицательного контролей от разведения сывороток

Определение рабочего разведения сывороток. Для определения оптимального разведения сывороток исследовали слабоположительные сыворотки крови кур, полученные на 13 сутки после иммунизации «Инактивированной эмульгированной вакцины против вируса гриппа птиц подтипа H5» производства ОАО «Покровского завода биопрепаратов» и отрицательные сыворотки в разведениях 1:2, 1:4, 1:8 и 1:16. Эти же сыворотки исследовали в РТГА. Оптимальное рабочее разведение сывороток определяли по наибольшей разнице процента ингибиции между средним значением отрицательного контроля и средним значением положительного контроля (табл. 3).

Как показано в табл. 3 и на рис. 2 наибольшую разницу процентов ингибиции между средним значением отрицательного контроля и средним значением положительного контроля наблюдали в разведении 1:2. Данное разведение было выбрано рабочим.

Позитивно-негативный порог. Для проведения качественного анализа устанавливали позитивно-негативный порог (ПНП), для чего 678 проб сывороток крови от невакцинированных домашних кур, уток, гусей, индеек, диких перелетных птиц (уток, тетеревов, глухарей, вальдшнепов), предварительно тестированных в РТГА на наличие антител к вирусу ГП подтипа H5N1, исследовали в К-H5-ИФА. Вычисляли процент ингибиции для каждой пробы, находили среднее значение ПИ и стандартное отклонение. Сумма $ПИ_{сред.}$ и двух стандартных отклонений определяла верхнюю границу отрицательных значений ПИ, сумма $ПИ_{сред.}$ и трех стандартных отклонений – нижнюю границу положительных значений, промежуточные значения считали сомнительными, то есть требующими подтверждения.

- отрицательные значения ПИ: менее 40%;
- сомнительные значения ПИ: 41-50%;
- положительные значения ПИ: 51% и выше.

Определение чувствительности и специфичности. Специфичность разработанной тест-системы на основе К-H5-ИФА определяли с использованием панели, состоящей из референтных гомологичных сывороток к H5 ГА подтипу, и гетерологичных сывороток к 14 ГА подтипам производства «Института зоопрофилактики» (Италия), а также сывороток к вирусам болезни Ньюкасла (НБ), синдрома снижения яйценоскости-76 (ССЯ-76), инфекционной бурсальной болезни (ИББ), пневмовирусу птиц (ПВП) и *Mycoplasma gallisepticum* (МГ) производства ФГУ «ВНИИЗЖ».

Как видно из табл. 4, неспецифическая реакция со всеми гетерологичными сыворотками отсутствовала, так как их ПИ не превышал фоновый уровень (реакция с неиммунной сывороткой).

При проведении серомониторинга в К-H5-ИФА и РТГА параллельно исследовали 244 сыворотки крови, принадлежащих 29

Таблица 4

Специфичность тест-системы на основе К-H5-ИФА

№	Сыворотка против	ПИ	№	Сыворотка против	ПИ
1	вируса ГП подтипа H5N1(ВНИИЗЖ)	98	14	вируса ГП подтипа H9N2 (Италия)	4
2	вируса ГП подтипа H1N1(Италия)	38	15	вируса ГП подтипа H10N1 (Италия)	1
3	вируса ГП подтипа H2N3 (Италия)	13	16	вируса ГП подтипа H11N9 (Италия)	1
4	вируса ГП подтипа H3N8 (Италия)	4	17	вируса ГП подтипа H12N5 (Италия)	1
5	вируса ГП подтипа H4N8 (Италия)	-6	18	вируса ГП подтипа H13N6 (Италия)	6
6	вируса ГП подтипа H5N2 (Италия)	76	19	вируса ГП подтипа H14 N5 (Италия)	-2
7	вируса ГП подтипа H5N3 (Италия)	95	20	вируса ГП подтипа H15N6 (Италия)	-4
8	вируса ГП подтипа H5N9 (Италия)	85	21	вируса НБ (ВНИИЗЖ)	8
9	вируса ГП подтипа H6N2 (Италия)	37	22	вируса ССЯ-76 (ВНИИЗЖ)	3
10	вируса ГП подтипа H7N1 (Италия)	24	23	вируса ИББ (ВНИИЗЖ)	9
11	вируса ГП подтипа H7N3 (Италия)	5	24	ПВП (ВНИИЗЖ)	11
12	вируса ГП подтипа H7N7 (Италия)	-4	25	МГ (ВНИИЗЖ)	18
13	вируса ГП подтипа H8N4 (Италия)	2	26	нормальная сыворотка крови кур	13

Таблица 5

Сравнение результатов, полученных при исследовании сывороток крови дикой птицы с использованием РТГА и К-Н5-ИФА

№	Вид птицы	К-Н5-ИФА	РТГА	№	Вид птицы	К-Н5-ИФА	РТГА
1	Черноголовый хохотун	0/1*	0/1	16	Вальдшнеп	0/7	0/7
2	Шилохвость	0/14	1/14	17	Тетерев	0/16	0/16
3	Чирок-свистунок	1/15	1/15	18	Глухарь	0/3	0/3
4	Огарь	0/1	0/1	19	Рябчик	0/1	0/1
5	Широконоска	0/11	0/11	20	Гусь-белолоб	0/3	0/3
6	Чайка сизая	0/30	0/30	21	Лебедь	3/5	3/5
7	Грач	0/2	0/2	22	Голубь	0/30	0/30
8	Чирок-трескунок	1/9	1/9	23	Павлин	0/4	0/4
9	Кряква	1/29	0/29	24	Дрозд-рябинник	0/1	0/1
10	Лысуха	0/23	0/23	25	Голубь вяхирь	0/2	0/2
11	Красноголовый нырок	0/4	0/4	26	Голубь клинтух	0/1	0/1
12	Утка-свиязь	0/2	0/2	27	Фазан	0/2	0/2
13	Чибис	0/2	0/2	28	Ворона серая	1/10	1/10
14	Красноголовая чернеть	1/4	1/4	29	Чайка морская	1/5	1/5
15	Утка дикая	2/7	2/7		Всего:	11 / 244	11 / 244

* – число положительных к общему количеству исследуемых сывороток

Таблица 6

Сравнение результатов, полученных при исследовании сывороток крови домашней птицы с использованием РТГА и Н5-К-ИФА

Вид птиц	К-Н5-ИФА	РТГА
Куры	64/108*	76/108
Утки	41/212	31/212
Гуси	218/392	188/392
Индоутки	18/51	17/51
Всего	335/763	308/763

* – число положительных к общему количеству исследуемых сывороток

Таблица 7

Определение чувствительности и специфичности К-Н5-ИФА относительно РТГА

Вид птиц	Относительная чувствительность, %	Относительная специфичность, %	Точность, %
Куры	84	100	89
Утки	100	94,5	95
Гуси	100	85	92
Индоутки	100	97	98

видам птиц (табл. 5).

Как представлено в табл. 5, общее количество положительных проб было одинаковым при использовании К-Н5-ИФА и РТГА.

Для подсчета относительной чувствительности и специфичности в К-Н5-ИФА и РТГА исследовали 763 сыворотки, принадлежащие индоуткам, уткам, гусям и курам с известным иммунным статусом. Результаты тестирования представлены в табл. 6.

Как показано в табл. 6 количество положительных проб, выявленных с использованием РТГА и Н5-К-ИФА, варьирует в зависимости от вида птиц.

Относительную чувствительность, специфичность и точность реакции определяли отдельно для каждого вида птиц. Результаты исследований представлены в табл. 7.

К-Н5-ИФА был более чувствителен по сравнению с РТГА при исследовании сывороток гусей, уток и индоуток, и менее чувствителен при исследовании сывороток крови кур.

Выводы

Тест-система на основе К-Н5-ИФА с использованием культурального антигена вируса ГП подтипа H5N1 обладает высокой чувствительностью и специфичностью и может найти широкое применение в ветеринарной практике для серологической диагностики вируса ГП подтипа Н5.

РЕЗЮМЕ

Разработана иммуноферментная тест-система для количественного определения антител к вирусу гриппа птиц подтипа H5 при тестировании проб в одном разведении. Титр антител определяли по проценту ингибиции, измеренному в рабочем разведении исследуемых проб. Определили позитивно-негативный порог для более объективной оценки иммунного ответа. Специфичность и чувствительность метода сравнивали с реакцией торможения гемагглютинации. Разработанную тест-систему применяли при проведении мониторинговых исследований для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H5 у диких птиц и изучении поствакцинального иммунитета у домашних птиц.

SUMMARY

An ELISA test-system was developed to quantify antibodies to avian influenza virus subtype H5 in samples tested in a single dilution. The antibody titre was determined according to the inhibition rate measured in a working dilution of tested samples. A positive-negative threshold for a more objective evaluation of the immune response was established. The specificity and sensitivity of the given method were compared with those of the hemagglutination inhibition test. The developed test-system was used for monitoring antibodies to avian influenza virus subtype H5 in wild birds and for studying the post-vaccination immunity in poultry.

Литература

1. Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц / под ред. Б.У. Келнека. М.: АКВАРИУМ БУК-, 2003. 1232 с.
2. Международная агропромышленная выставка «АГРОРУСЬ 2005». Круглый стол «Актуальные проблемы промышленного птицеводства – грипп птиц» / ЛЕНЭКСПО Вып 1. СПб, 2005, 14 с.
3. Троценко Н.И. Практикум по ветеринарной вирусологии / Троценко Н.И., Белоусова Р.В., Преображенская Э.А. // 2-е изд., перераб. и доп. М.: Колос, 1999.
4. Циванюк М.А. Получение культурального вируса гриппа птиц подтипа H5N1 и его использование в качестве антигена для серологических реакций / М.А. Циванюк, Н.Н. Луговская, Н.С. Мудрак [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных Владимир, 2007. С. 144-155.
5. Чвала И.А. Разработка диагностического набора для определения уровня антител к вирусу гриппа птиц в РТГА/ И.А.Чвала, М.А.Циванюк, Н.Н. Луговская [и др.] //3-й Международный ветеринарный конгресс по птицеводству. М.: 2007. С. 73–78.
6. Ямникова С.С. Стратегия и тактика борьбы с гриппом на различных этапах эпидемиологического процесса /С.С. Ямникова, О.Н. Виткова, М.В Калмыков [и др.] //Ветеринарная медицина 87: міжвідомчий тематичн. наук. збірник. Харків, 2006. С. 307-312.

УДК 619:616.98:587.832.1:598.2:573.6.086.83:57.083.3

М.А. Циванюк, Н.Н. Луговская, Н.С. Мудрак, В.В. Дрыгин, Е.В. Белик

НЕПРЯМОЙ ВАРИАНТ ИФА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГРИППА ПТИЦ ПРИ ТЕСТИРОВАНИИ ПРОБ В ОДНОМ РАЗВЕДЕНИИ

Введение

Грипп птиц (ГП) – инфекционная болезнь домашних, синантропных и диких птиц, которая проявляется в виде эпизоотий и может протекать как в тяжелой форме, так и бессимптомно. Возбудителем заболевания является РНК-содержащий вирус с сегментированным геномом семейства Orthomyxoviridae, рода *Influenzavirus*, типа А [5, 7, 11].

В настоящее время практически все страны столкнулись с проблемой распространения гриппа птиц, обусловливающей не только экономические потери, связанные с гибелью птицы, вынужденным убоем, затратами на проведение ветеринарно-санитарных мероприятий, но и угрозу возникновения пандемии, которая может характеризоваться высокой смертностью, социальными проблемами и громадным экономическим ущербом [2, 8, 12, 13].

Ретроспективная диагностика является основополагающим фактором для своевременной защиты поголовья от инфекционных заболеваний. Важную роль играют серологические методы, такие, как реакция диффузионной преципитации (РДП), реакция торможения гемагглютинации (РТГА), реакция нейтрализации (РН) и иммуноферментный анализ (ИФА), позволяющие не только обнаружить специфические антитела на ранних стадиях болезни, но и оценить иммунитет, полученный в результате вакцинации [10].

Непрямой вариант ИФА – высокочувствительный и специфичный метод, удобен для анализа больших количеств образцов малого объема в лабораториях с самым